



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 00 364 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 197 00 364.8
⑳ Anmeldetag: 8. 1. 97
㉑ Offenlegungstag: 9. 7. 98

⑥ Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/00
C 12 Q 1/24
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/70
G 01 N 1/40
G 01 N 33/68
// (C12Q 1/24,C12R
1:01)(C12Q 1/24,C12R
1:645)

DE 197 00 364 A 1

⑦① Anmelder:
Bayer AG, 51373 Leverkusen, DE

⑦② Erfinder:
Dürr, Hansjörg, Dr., 51399 Burscheid, DE;
Brüggemeier, Ulf, Dr., 51379 Leverkusen, DE;
Dierksen, Karsten, Dr., 51061 Köln, DE; Hehnen,
Hans-Robert, Dr., 53721 Siegburg, DE; Neumann,
Rainer, Dr., 50937 Köln, DE; Kuckert, Eberhard, Dr.,
51375 Leverkusen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Elektrokinetische Probenvorbereitung

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren, das es erlaubt, Makromoleküle (Nukleinsäuren, Proteine, Viren und Bakterien) aus biologischen Materialien, wie Blut, Serum, Liquor, Urin, Pflanzen, Zellen, Zellüberständen etc. und Aufbereitungen daraus, zu isolieren, aufzukonzentrieren und analytisch zugänglich zu machen. Die Makromoleküle werden in einer Kapillare an einer Membran elektrokinetisch aufkonzentriert.

DE 197 00 364 A 1

Biologische Makromoleküle wie z. B. Proteine und Nukleinsäuren, aber auch kleine Teilchen wie Viren und Bakterien sind sowohl diagnostisch, als auch für die medizinische Forschung, von großer Bedeutung.

Die etablierten Verfahren zur Charakterisierung dieser Substanzen aus biologischen Matrices sind z. T. sehr aufwendig. So wird beispielsweise für Nukleinsäure-Analysen die Target-Nukleinsäure isoliert, anschließend amplifiziert und mit einem geeigneten Analysenverfahren ausgewertet. Die Isolierung ist zeitaufwendig und schwierig zu automatisieren. Um ausreichende Mengen Nukleinsäure für die etablierten Analysenverfahren zu erhalten, muß die Nukleinsäure in einem weiteren Schritt durch Amplifikation vervielfältigt werden. Breitere Anwendung hat hier bisher nur die Polymerase Kettenreaktion (PCR) gefunden.

Mit der "Elektrokinetischen Probenvorbereitung" kann die gesamte Nukleinsäure-Analytik von der Isolierung bis zur Auswertung, auch unter Vermeidung der zusätzlichen Amplifikation, mit bisher nicht gekannter Schnelligkeit und Automatisierung durchgeführt werden.

Aufreinigung und Diagnose von Proteinen

Da unterschiedliche Proteine individuelle physikalische Eigenschaften haben, gibt es keine universell anwendbaren Verfahren zur Aufreinigung. Anwendung finden überwiegend chromatographische und elektrophoretische Verfahren, Fällungen, Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und die Größenausschlußchromatographie (Doonan, S. Methods Mol. Biol., 1996, 59, Totowa, N.J., Humana, 1996, 405ff). Für diagnostische Anwendungen haben sich immunologische Verfahren durchgesetzt, die das Zielprotein über spezifische Antikörpererkennung nachweisen.

Aufreinigung und Diagnose von Nukleinsäuren

Um aus biologischen Material, für diagnostische Anwendungen, Nukleinsäuren zu isolieren, sind, je nach Beschaffenheit des Materials, unterschiedliche Aufschlußverfahren und anschließende Reinigungsverfahren nötig. Dabei muß wiederum gewährleistet sein, daß die zu isolierende Nukleinsäure nicht zerstört wird. Insbesondere RNA kann leicht durch ubiquitäre RNAsen degradiert werden, so daß der Zusatz von Inhibitoren für diese störenden Enzyme nötig ist (Walker, J. M., Methods Mol. Biol., 1984, 2, Clifton, N.J., Humana, 1984, 113ff). Im folgenden werden die zur Zeit üblichen Verfahren umrissen:

Ein einfacher Fall für die Gewinnung von Nukleinsäure ist die Isolierung aus einer reinen Bakterienkultur: Im Falle von E. coli setzt alkalische Lyse die Nukleinsäure frei; nach Zentrifugation und Neutralisation kann dieses Rohprodukt direkt für PCR Ansätze verwendet werden (Rofls, A. et al. PCR: Clinical Diagnosis and Research, Berlin, Springer, 1992).

In der Regel ist das Probenmaterial für die medizinische Diagnostik aber heterogener aufgebaut; Blut, Urin, Liquor, Abstrichmaterial, Sputum, Gewebeproben, Faeces, z. B. verlangen nach spezifischen Aufschlußmethoden, die wiederum je nach Fragestellung (Detektion von Bakterien, Pilzen, Viren oder genomischer Nukleinsäure aus dem Trägerorganismus) modifiziert werden müssen.

Nachfolgend eine kurze Zusammenfassung der gängigsten Aufreinigungsverfahren für diese Proben:

Phenolextraktion der Nukleinsäure mit Proteinase K-Behandlung.

Retardierung der Nukleinsäure an Membranfilter; wird aufgrund der Verstopfungsproblematik nur für vorgereinigte Proben oder gering belastete Proben – wie Urin – angewandt.

Festphasen, an die Nukleinsäuren gebunden werden können, ermöglichen Trennungen von Stör- und Begleitsubstanzen durch Waschschritte. Beispiele hierfür sind: a) Absorption an Glasmilch in Natriumjodidpuffer (Maiwald, M. et al., BIOforum 1994, 17, 232–237.). b) Anlagerung der negativ geladenen Nukleinsäure an schwach basische Polymere (EP 0 707 077 und US 5 434 270). c) Zellulosematrices zur direkten Absorption von Blut, worauf dann alle Behandlungsschritte inklusive Nukleinsäurefreisetzung und Aufreinigung erfolgen. (Del Rio, S.A. et al. Biotechniques, 1996, 20, 970–974). d) Silicamikropartikel, welche auch in Membranen eingebettet sein können, können ebenfalls zur Nukleinsäure-Aufreinigung eingesetzt werden (WO 95/34569). Ionenaustauschermembranen (US 832 284) oder chemisch modifizierte Silica-Phasen (EP 0 648 777) gehören ebenfalls zu dieser Gruppe.

Es sind auch Elektroelutionsapparaturen im Markt (z. B. von Biometra), um makroskopisch Proteine, Nukleinsäuren oder Viren aus Gelen zu extrahieren (EP 380 357).

Um ausreichende Mengen an Nukleinsäure zu erhalten, schließt sich an die Isolierung der Nukleinsäuren üblicherweise ein Amplifikationsschritt an (EP 229 701).

Ansätze zur Automation der Nukleinsäure-Analytik gibt es in Form der Anionenaustauschchromatographie und der Nukleinsäure-Adsorption mit Pipettierrobotern (BioRobot von Quiagen). In einem japanischen Patent wird die Nukleinsäure in einer Kapillare immobilisiert, um darin die Amplifikation durchführen zu können (JP 7107962).

Aufreinigung und Diagnose von Viren

Viren werden üblicherweise mit folgenden Verfahren isoliert und aufkonzentriert:

Ultrazentrifugation, Elektroextraktion, Größenausschlußtrennung, Affinitätschromatographie und Fällung (Polson, Alfred, Prep. Biochem., 1993; 23, Dekker, New York, N. Y., 1993). Für diagnostische Zwecke werden entweder immunologische Verfahren auf die Proteinhülle oder nukleinsäureanalytische Verfahren nach Freisetzung der viralen Nukleinsäuren eingesetzt.

Bakterien werden üblicherweise durch Aufstreichverfahren auf Nährmedien vereinzelt und hochgezogen. Für die Isolierung und Charakterisierung stehen immunologische Verfahren – z. B. durch Fluoreszenzmarkierung –, Nukleinsäurebestimmungsmethoden – nach Zellyse – zur Verfügung. 5

Alle Verfahren, unabhängig vom Makromolekül, sind zeitaufwendig, beinhalten zahlreiche Verdünnungsschritte und gewährleisten häufig nicht die Abtrennung von Störfaktoren. Im nachfolgenden soll der technische Stand der Mikrokanaltechnologie und der amplifikationslosen Nukleinsäure-Analytik kurz skizziert werden.

Mikrokanäle 10

Die Kapillarelektrophorese ist eine relativ junge analytische Trenntechnik (St. Claire R. L., Anal. Chem. 1996, 68, 569R–586R). Das Prinzip beruht auf der Trennung von Analyten in einer elektrolytgefüllten Kapillare durch Anlegen eines Hochspannungsfelds zwischen den Kapillarenden.

Kapillarelektrophoretische Analysenverfahren werden seit mehreren Jahren zur Analyse von biologischen Makromolekülen wie Proteinen (WO 93/22665), Nukleinsäuren (Heller, C., J Chromatogr. A, 1995, 698, 19–31) und neuerdings auch Viren (DE 44 38 833) eingesetzt. Die Detektion erfolgt entweder direkt mit UV oder mittels Fluoreszenzdetektion nach Markierung der Makromoleküle (Pentoney, S. L., Jr., et al. Handbook of Capillary Electrophoresis, S. 147, Landers, J. P. (Ed.) Boca Raton, CRC Press, 1994). Fast alle Gerätehersteller bieten Analysenkits für die Nukleinsäure-Analyse mit der CE an. Seit 1995 gibt es auch einen vollautomatischen Nukleinsäure-Analysator auf Basis der CE, den ABI Prism 310 von Perkin-Elmer (Applied Biosystems). Die Injektion der Nukleinsäure in die Kapillare erfolgt üblicherweise elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung. Die elektrokinetische Aufgabemenge ist aber limitiert, da sonst Peakverbreiterung und Probendiskriminierung auftritt (Butler, J. M., et al. J Chromatogr. B, 1994, 658, 271–280). 15

Durch Einführung der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion in die Kapillarelektrophorese (St. Claire R. L., Anal. Chem. 1996, 68, 569R–586R), die von Beckman auch bereits kommerzialisiert ist, gelang eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung. Damit lassen sich auch intakte Viren mittels CE analysieren (DE 44 38 833). Proteine können nur nach spezifischer Modifikation mit Fluoreszenz detektiert werden. 20 25

Aufkonzentrierung im Mikrokanal 30

Ein prinzipieller Nachteil der CE ist das geringe Injektionsvolumen, das nur wenige Nanoliter beträgt. Es gibt eine Vielzahl von Versuchen diesen Nachteil zu kompensieren (St. Claire R. L., Anal. Chem. 1996, 68, 569R–586R). Dazu gehören isotachophoretische Aufkonzentrierung und Stacking die beide zu einer Fokussierung der Probenbestandteile im Injektionsvolumen führen. Von Guzmán wurde 1993 eine spezifische Festphasenadsorption in der Kapillare zur Probenaufkonzentrierung zum Patent angemeldet (WO 93/05390). Durch spezifische molekulare Wechselwirkung werden spezielle Verbindungen einer Probe festgehalten oder durchgelassen. Eine Weiterentwicklung dieser Verfahren wurde von Tomlinson et al. mit der membrane preconcentration capillary electrophoresis gemacht (Tomlinson, A. J., et al. J. High Res. Chromatogr. 1995, 18, 381–383). Durch Einführen einer Umkehrphasenmembran in die Kapillare werden lipophile Probenbestandteile in einer Festphasenextraktion in der Membran festgehalten, anschließend mit einem organischen Lösungsmittel durch die Membran eluiert und kapillarelektrophoretisch getrennt. 35 40

CE-Chips

Capillary Array Electrophoresis wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen, hauptsächlich für die Nukleinsäure-Sequenzierung, entwickelt und zum Teil auch zum Patent angemeldet (WO 96/04547). In photolithographisch hergestellte Mikrokapillarsystemen wurden fluoreszierende Moleküle spannungsabhängig gesteuert und analysiert. 45

Ebenfalls auf Basis der Chip-Technologie wurden Mikromaschinen patentiert, die durch ein Netzwerk von Kanälen und elektrischen Schaltern eine Prozeßsteuerung von Lösungen zu synthetischen oder analytischen Zwecken möglich macht (WO 96/15450). 50

Amplifikationsfreie Nukleinsäure-Analysen

Auf Basis der hohen Empfindlichkeiten der Fluoreszenzdetektion wurde die Durchflußzytometrie zur single molecule detection zum Patent angemeldet (WO 90/14589).

Die Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie wurde ebenfalls für biologische Screeningverfahren über single molecule detection eingesetzt (EP 731 173). Auch High Throughput Nukleinsäure-Sequenzierung wird auf Basis dieser Technologie bearbeitet (Harding, J. D., et al. Trends in Biotechnology, 1992, 10, 55–57). Diese Verfahren beruhen auf dem Nachweis eines einzelnen Fluoreszenzmoleküls in einem sehr kleinen Volumenelement. 55

Mit der vorliegenden Erfindung sollte ein automatisiertes Verfahren entwickelt werden, das es erlaubt Makromoleküle (Nukleinsäuren, Proteine, Viren und Bakterien) aus biologischen Materialien, wie Blut, Serum, Liquor, Urin, Pflanzen, Zellen, Zellüberständen etc. und Aufbereitungen daraus, zu isolieren, aufzukonzentrieren und analytisch zugänglich zu machen. 60

Der zentrale Bestandteil des Probenvorbereitungsmoduls ist ein thermostatisierbarer Mikrokanal mit einer eingebrachten Membran. Dieser, mit einer leitenden Flüssigkeit gefüllte Kanal, steht auf beiden Seiten in Kontakt mit austauschbaren Gefäßen. 65

Durch das Anlegen einer Potentialdifferenz zwischen den Probengefäßen können geladene Moleküle elektro-phoretisch mobilisiert werden. Durch die Möglichkeit eine Druckdifferenz anzulegen kann zusätzlich ein laminarer Fluß im Mikrokanal erzeugt werden. Eine vereinfachte schematische Darstellung befindet sich in Fig. 1–5.

In einem Mikrokanal (1) wird eine Membran (2) eingebracht die geeignet ist das gewünschte Makromolekül zurückzuhalten. Durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) an die Enden des Mikrokanals (3, 4) wird ein Teil der Probe in den Kanal injiziert (Fig. 1). Die Injektion wird so lange fortgesetzt bis sich eine ausreichende Menge des gewünschten Makromoleküls im Mikrokanal befindet. Durch die Kombination der Parameter pH-Wert, Membraneigenschaften, Beschaffenheit des Mikrokanals, Polarität der Spannung und Richtung des Druckgradienten kann die Injektion auf das gewünschte Zielmolekül abgestimmt werden, so daß entweder nur das gewünschte Makromolekül in den Kanal gelangt oder durch die Membran festgehalten wird.

Der Mikrokanal hat einen Innendurchmesser von 10–100 µm und eine Gesamtlänge von 3–50 cm. Der Mikrokanal wird aus einem elektrisch nichtleitendem Material wie Polymer, Glas oder Quarz gefertigt. Es sind prinzipiell alle synthetischen Polymere geeignet. Das Polymer muß innert gegenüber den eingesetzten Pufferlösungen sein und ist idealerweise durchlässig für optische Detektionsverfahren (z. B. Polycarbonat, Polycarbonat, Polyesteracrylat, Polymethacrylat, Polyurethan, Polyacrylamid) aber auch PTFE ist geeignet. Um günstige Oberflächeneigenschaften zu erhalten kann der Kanal innen mit einem Polymer beschichtet werden (z. B. Polyacrylamid oder Polyvinylalkohol).

Unabhängig vom Typ des untersuchten Makromoleküls können Membranen eingesetzt werden die nach dem Größenausschlußprinzip arbeiten (Ultrafiltrationsmembran). Der Größenausschlußbereich muß der Molekülgröße des Makromoleküls angepaßt werden. Die Spannweite der Membranen reicht von Mw 3000, für kleine Proteine oder Nukleotide, über Größenausschlußbereiche im unteren nm-Bereich, für große Nukleinsäuren und Viren, bis hin zu 0,45 mm, für Zellen. Bei den Membranen handelt es sich um mikrostrukturierte Polymere, vorzugsweise um Polyethersulfon (PES), Polyester, vliesgestütztem Acrylpolymer, Polytetrafluorethylen (PTFE), Polysulfon, Polypropylen (PP), Glasfaser, Nylon oder Polycarbonat. Zusätzlich können Ionenaustauschmembranen und Adsorptionsphasen eingesetzt werden. Die Wahl dieser Membranen richtet sich aber nach der Art des Makromoleküls und wird daher individuell behandelt.

Nach Wechsel des Probengefäßes (3) gegen ein Konzentrationspuffergefäß (7) wird das injizierte Makromolekül durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) vor oder in der Membran (2) aufkonzentriert (Fig. 2). Das gewünschte Makromolekül befindet sich dann in einem Volumen von wenigen Nanolitern.

Nach Wechsel der Gefäße (4, 7) gegen die Reagenziengefäße (8, 9) können die dort enthaltenen Lösungen oder Bestandteile daraus, durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) in den Mikrokanal (1) gebracht werden (Fig. 3). Die Bedingungen werden so gewählt, daß das Zielmolekül dabei aufkonzentriert bleibt. Das Zielmolekül kann auf diese Weise enzymatisch oder chemisch modifiziert, und/oder durch Hybridisierung bzw. immunologische Erkennung spezifisch erkannt werden. Die Thermostatisierbarkeit des Mikrokanals (1) und die Möglichkeit die Reagenziengefäße mehrfach zu wechseln erlaubt komplexe Umsetzungen und zyklische Prozesse. In diesem Modifizierungsschritt werden auch eventuell notwendige Derivatisierungsreaktionen für eine Fluoreszenz oder laserinduzierte Fluoreszenzdetektion durchgeführt.

Die erforderlichen Reaktionstemperaturen werden durch Thermostatisierung des Mikrokanals (1) erreicht. Dazu wird entweder entsprechend temperierte Luft oder Flüssigkeit am Mikrokanal vorbeigeleitet. Die Wandstärke des Mikrokanals wird dabei so gewählt, daß ausreichende Wärmeabfuhr gewährleistet ist.

Nach Wechsel der Reagenziengefäße (8, 9) gegen die Puffergefäße (10, 11) wird das Zielmolekül, durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) mobilisiert (Fig. 4). Durch optische Detektionsverfahren (12), wie Absorption oder Fluoreszenz, kann das Molekül direkt im Mikrokanal (1) analytisch bestimmt werden (13). Es stehen die analogen Detektionsverfahren wie in der CE zur Verfügung (St. Claire R. L., Anal. Chem. 1996, 68, 569R–586R).

Dazu wird der Mikrokanal entweder komplett oder an einer Stelle transparent für optische Strahlung gemacht. Dazu muß die Transmission der Anregungsstrahlung und der Fluoreszenzstrahlung gewährleistet sein. Vorzugsweise handelt es sich um die eingangs erläuterten nichtleitenden Materialien. Die Fluoreszenzstrahlung wird entweder senkrecht oder in Reflexion zur Einstrahlwellenlänge gemessen.

Das hochkonzentrierte Analysentarget steht aber auch für weitergehende Analysen zur Verfügung (Fig. 5). So kann das Zielmolekül in das Analysengefäß (14) oder in oder auf ein beliebiges anderes Analysentarget fraktioniert werden.

Im Analysengefäß (14) befinden 1–1000 ml eines für die weitere Analyse geeigneten Puffers. Beispielsweise handelt es sich um PBS-Puffer oder einen Tris-Glycin-Puffer. Bei dem Analysengefäß (14) kann es sich auch um ein planares Analysentarget handeln, beispielsweise um einen massenspektrometrischen Probenenträger. Der elektrische Kontakt wird entweder direkt über das leitende Analysentarget erreicht oder durch Benetzung der Oberfläche zwischen Elektrode und Mikrokanal mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit.

Wird der Kanal zusätzlich verzweigt kann das aufkonzentrierte Zielmolekül durch Umschalten von Druck oder Spannung in weitere Kanäle für weitergehende Analysen oder Umsetzungen gebracht werden und ist daher direkt kompatibel mit der CE-Chiptechnologie (WO 96/04547).

Fraktionierte Makromoleküle können mit allen denkbaren Verfahren weiter analysiert werden. Das hochkonzentrierte Makromolekül wird in weniger als einem Mikroliter eluiert und kann direkt in geeignete flüssige Matrices oder auch auf feste Probenenträger aufgebracht werden.

Eine schematische Darstellung des parallelen Aufbaus befindet sich in Fig. 6. Die Mikrokanäle (1) werden aus nichtleitenden Materialien, wie Polymer, Glas, Quarz oder Keramik (15) hergestellt und gegebenenfalls beschichtet. Die Kanalblöcke werden mit einer Membranzwischenschicht (2) zusammengefügt, so daß die Kanäle an der Membran aufeinanderstoßen. Die Anordnung der Kanäle richtet sich nach dem Probenformat. Nicht dargestellt sind die nachfolgenden Zusatzeinrichtungen. Zur Abfuhr der Joule'schen Wärme werden gegebenenfalls zusätzliche Thermostatisierungselemente eingeführt. Die Kanäle werden an den Enden so verzüngt, daß sie in jeweiligen Gefäße eingeführt werden können. Für den elektrischen Kontakt werden, entweder an den Kanalenden oder in den Gefäßen, Elektroden angebracht und mit einer Hochspannungsquelle versorgt.

Für die Thermostatisierung werden beispielsweise Kanäle in den Analysenblock gelegt, die senkrecht zur Richtung und zwischen den Ebenen der Mikrokanäle liegen. Durch diese Kanäle kann entsprechend temperierte Luft oder Flüssigkeit gepumpt werden.

Für extrem salzhaltige Proben wurde eine parallele Kapillaranordnung entwickelt. Die schematische Darstellung die-

ses Moduls befindet sich in **Fig. 7**. Neben dem Mikrokanal (**1**) befindet sich der deutlich breitere Kanal (**16**). Die Höhe des Kanals entspricht der Dimension des Mikrokanals (10–100 µm), so daß die Joule'sche Wärme nach wie vor gut abgeführt werden kann. Die Breite des Kanals (100 µm bis 10 mm) erlaubt aber Flüsse die um bis zu 10^3 höher liegen als im Mikrokanal (**1**). Die Membran wird zwischen die Modulblöcke (**15**) eingespannt. Das gesamte Modul ist damit 3 bis 10 cm lang, 1 bis 20 mm breit und 0,1 bis 10 mm stark. Durch parallele Anordnung kann auch ein analoger Aufbau wie in **Fig. 6** erreicht werden. Die Makromoleküle werden im Kanal (**16**) aufkonzentriert und dann über den Transferkanal (**17**) in den Mikrokanal überführt und analog den Verfahren aus **Fig. 1–6** weiter bearbeitet. Die schematische Anreicherung von Makromolekülen aus salzhaltiger Lösung ist am Beispiel von Nukleinsäuren nachfolgend beschrieben.

Die Anreicherung von Nukleinsäure aus salzhaltiger Lösung erfolgt durch Anlegen einer Spannung an den Flachkanal (**16**) (**Fig. 8a**). Neben dem Überschuß an anorganischen Anionen (kleine schwarze Kugeln) wird auch die Nukleinsäure aus der Probe injiziert. Die anionischen Salze wandern durch die Membran (**2**) und werden damit von der Nukleinsäure entfernt. Die Spannung wird so lange beibehalten, bis alle Nukleinsäuren an der Membranoberfläche immobilisiert sind (**Fig. 8b**). Wird nun zwischen dem Flachkanal (**16**) und dem Mikrokanal (**1**), wie angegeben eine Spannung angelegt, so wandert die aufgereinigte und aufkonzentrierte Nukleinsäure von der großen Membranoberfläche des Flachkanals (**16**) zur Membran des Mikrokanals (**Fig. 8c**) und steht anschließend für die weitere Behandlung und Analyse (**Fig. 3–6**) zur Verfügung.

1. Beschreibung der Nukleinsäuren-Aufkonzentrierung

1.1. Nukleinsäure wird mit einem geeigneten, etablierten Verfahren (Lyse, Hydrolyse, Ultraschall, etc.) aus der zu untersuchenden Probe freigesetzt und mit einem geeigneten sauren Extraktionspuffer versetzt. Der Puffer muß so konzipiert sein, daß nichtnukleotidische Bestandteile der Lösung keine anionische Überschußladung tragen. Unterhalb eines pH-Werts von ca. 5 zeigen Proteine keine negative Überschußladung mehr.

Es können anorganische Säuren wie Salzsäure, Phosphorsäure oder Schwefelsäure wie auch organische Phosphorsäurederivate oder Sulfonsäuren eingesetzt werden. Vorzugsweise wird aber ein polymergebundener, saurer Ionenaustauscher (z. B. Polystyrolsulfonsäure) eingesetzt. Durch Verwendung des Ionenaustauschers wird der saure pH-Wert erreicht ohne zusätzlich Anionen in die Lösung einzuführen. Die elektrokinetische Nukleinsäure-Extraktion wird dadurch begünstigt.

1.2. Die Nukleinsäure wird aus dieser sauer gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode eingeführt und auf kationisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (**4**) (**Fig. 1**) wird auf anodisches Potential gebracht und der Mikrokanal (**1**) wird mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllt.

Die Zusammensetzung des Elektrolyts richtet sich nach der Art der Immobilisierungstechnik. Vorzugsweise handelt es sich um einen wäßrigen Puffer auf Borat-, Phosphat- oder Citrat-Basis. Auch Glycin ist ein geeignetes Pufferion. Die Pufferkonzentration liegt zwischen 10 und 100 mmol/l. Der pH-Wert liegt zwischen 2,5 und 8,5. Beispielsweise Natriumcitrat (20 mmol/l, pH 5,0) oder Tris/Borat (100 mmol/l, pH 8,5). Wahlweise wird ein Modifier, vorzugsweise ein chaotropes Agens, wie z. B. Harnstoff in molarer Konzentration zugesetzt. Die Aufgabe kann mittels UV- oder Fluoreszenzdetektion – nach vorheriger Derivatisierung – im Mikrokanal (**1**) verfolgt werden.

1.3. Die extrahierte Nukleinsäure wird im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran unter Beibehaltung der Spannung immobilisiert und konzentriert (**Fig. 2**). Für Nukleinsäuren eignen sich zusätzlich zu den Größenausschlußmembranen auch weiche Anionenaustauscher beispielsweise auf Aminbasis. Vorzugsweise handelt es sich um Alkylamin-, Imidazol- oder Pyrrolidon- substituierte Polymere. Die Nukleinsäuren können auch durch Adsorption an Membranen retardierte werden. Beispielsweise enthalten die Membranen Nanopartikel, vorzugsweise Silicabasierend oder Metalloxidpigmente. Mit immobilisierten Oligonukleotiden werden spezifische Nukleinsäurestränge durch Festphasenhybridisierung immobilisiert.

1.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierte Nukleinsäure kann vielfältig modifiziert und analysiert werden (**Fig. 3**). Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Die Polarität der Spannung wird wie bei der Extraktion und Fokussierung beibehalten. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem enzymatische Spaltungen, Sanger-Sequenzierungen, Gensonden-Hybridisierung, aber auch PCR-Reaktionen möglich.

Beispielsweise kann die Nukleinsäure mit interkalierenden Farbstoffen markiert werden. Vorzugsweise handelt es sich um fluoreszierende Derivate, wie Ethidiumbromid, Acridinorange, bzw. deren Dimeren wie 1,1'-(4,4',7,7'-Tetramethyl-4,7-diazaundecamethylen)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro-2-methyl-(benzo-1,3-oxazol)-2-methyliden]-chinolinium Tetraiodid (YOYO). Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in erster Linie nach der gewählten Detektionseinheit. YOYO ist beispielsweise ideal für die Fluoreszenzdetektion nach Anregung mit einem Argon-Laser, während das entsprechende YO-PRO-Diimer ideal zum Infrarot-Laser paßt. Diese Farbstoffe zeichnen sich auch dadurch aus, daß kaum Hintergrundfluoreszenz auftritt, da diese Farbstoffe nur im interkalierten Zustand fluoreszieren. Das positiv geladene YOYO kann beispielsweise vom Reaktionsgefäß (**9**), unter Beisaltung der Fokussier-Spannung, elektrokinetisch eingeführt werden.

Deutlich höhere Spezifität kann beispielsweise durch eine fluoreszenzmarkierte Gensonde erreicht werden. Die Gensonde besteht aus einer zur Zielnukleinsäure komplementären Nukleotidsequenz die eine oder mehrere Fluoreszenzfarbstoffe trägt. Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in erster Linie nach der gewählten Detektionseinheit. Fluoresceinisothiocyanat wird vorzugsweise für die Fluoreszenzdetektion nach Anregung mit einem Argon-Laser eingesetzt.

Enzymkatalysierte Reaktionen wie Restriktionsenzymverdau, PCR-Reaktion und Sanger Sequenzierung werden durchgeführt indem die erforderlichen Enzyme und benötigten Substrate zur Nukleinsäure im Mikrokanal transportiert werden.

1.5. Die konzentrierte Nukleinsäure kann in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanoliter eluiert werden und steht für weitere Analysen zur Verfügung.

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Anode im Analysengefäß (**14**) (**Fig. 5**) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal und das Puffergefäß (**11**) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben genannten Zusammensetzung gefüllt.

Als nachfolgende Analysen können PCR-Reaktion, CE-Trennungen, DNA-Sequenzierungen, massenspektrometrische Analysen oder molekularbiologische Verfahren durchgeführt werden.

1.6. Innerhalb des Mikrosystems ist die Nukleinsäure elektrophoretisch analysierbar (**Fig. 4**). Wie bei der Elution wird das Puffergefäß (**10**) dabei auf anodisches Potential gebracht. In einem geeigneten Siebmedium können Nukleinsäure-Fragmente größenabhängig getrennt werden.

Die Puffergefäße (**10, 11**) sowie der Mikrokanal (**1**) werden dazu mit einer polymerhaltigen Pufferlösung gefüllt. Vorzugsweise handelt es sich dabei um lineare lösliche Polymere zum Beispiel Acrylamid, Polyvinylalkohol, Zellulose (modifiziert und unmodifiziert), Dextran, oder Agarose. Die sonstige Pufferzusammensetzung entspricht der allgemeinen Zusammensetzung.

1.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Sonden, fluoreszenzmarkierter Terminatoren in der Sanger-Sequenzierung oder interkalierender Farbstoffe ist eine direkte Fluoreszenzdetektion der Nukleinsäure im Mikrosystem möglich.

2. Viren

2.1. Die virushaltige Probe wird auf einen solchen pH-Wert gebracht, daß das zu untersuchende Virus, oder die zu untersuchenden Viren, eine negative Überschußladung trägt. Falls erforderlich können vorher Nukleaseverdaus oder Virusmodifikationen durchgeführt werden.

Die geeigneten Puffer sind bereits im allgemeinen Verfahren beschrieben worden. Der pH-Wert des Puffers muß deutlich über dem pK-Wert des Virus liegen. Auf saure Puffer wie Natriumcitrat wird daher verzichtet, ebenso finden Modifizierungsreagenzien keine Anwendung. Nukleaseverdaus werden vorzugsweise durch Zugabe von RNAsen oder DNAsen durchgeführt. Hervorragend geeignet ist beispielsweise die Benzonase. Modifizierungsreaktionen können in Form von Anfärbungsreaktionen mit interkalierenden Farbstoffen (vgl. 1.4) oder durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt werden. Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in beiden Fällen nach der gewählten Detektionsart.

2.2. Die negativ geladenen Viren werden aus dieser gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode gebracht und auf kationisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (**4**) (**Fig. 1**) wird auf anodisches Potential gebracht und der Mikrokanal (**4**) wird mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllt.

Die Zusammensetzung des Elektrolyts entspricht der allgemeinen Pufferzusammensetzung. Die Aufgabe kann mittels UV oder Fluoreszenz verfolgt werden. Während der Injektion kann zusätzlich eine Druckdifferenz zwischen den Puffergefäßen (**3** und **4**) angelegt werden.

2.3. Die extrahierten Viren werden im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran immobilisiert und konzentriert (**Fig. 2**). Die Membran arbeitet nach dem Größenausschlußprinzip, wobei die Porengröße virusabhängig zwischen 10 und 200 nm liegt.

2.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierten Viren können vielfältig modifiziert und analysiert werden (**Fig. 3**). Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem alle Derivatisierungsverfahren für Proteine und Nukleinsäuren möglich (vgl. 1.4 und 3.4). Die Viren können auch auf der Membran lysiert und anschließend die Nukleinsäuren und/oder die Proteine analysiert werden (vgl. 1.4–1.7 und 3.4–3.7).

Die Größenausschlußmembran muß im Fall der Viruslyse so dimensioniert sein, daß die Zielproteine, bzw. Nukleinsäuren ebenfalls retardiert werden. Es ist prinzipiell jedes Lyseprotokoll geeignet. Vorzugsweise finden denaturierende Bedingungen wie extreme pH-Werte, chaotrope Reagenzien oder Detergenzien Anwendung. Beispiele sind verd. Natronlauge, Guanidinium-Hydrochlorid oder Natriumdodecylsulfat (SDS). Durch Verwendung nichtionischer Detergenzien (z. B. NP-40) kann von behüllten Viren die Lipoproteinmembran entfernt werden.

2.5. Die konzentrierten Viren können in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanoliter eluiert werden und stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Anode im Analysengefäß (**14**) (**Fig. 5**) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal (**1**) und das Puffergefäß (**11**) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben genannten Zusammensetzung gefüllt. Nach Fraktionierung in ein puffergefülltes Analysengefäß (**14**) können mit den Viren beispielsweise Pathogenitätsassays oder CE-Trennungen durchgeführt werden. Nach Fraktionierung auf ein planares Analysentarget (**14**) können die Viren beispielsweise direkt elektronenmikroskopisch untersucht werden.

2.6. Innerhalb des Mikrosystems sind die Viren elektrophoretisch analysierbar. Wie bei der Elution wird das Puffergefäß (**10**) dabei auf anodisches Potential gebracht (**Fig. 4**).

2.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierender Verfahren für Proteine oder Nukleinsäuren (vgl. 1.4 und 3.4) können die Viren auch fluoreszenzspektroskopisch identifiziert werden.

3. Proteine

3.1. Die proteinhaltige Probe wird auf einen pH-Wert gebracht der mindestens eine log-Stufe neben dem pK-Wert des Proteins liegt. Wenn es die Löslichkeitseigenschaften des Proteins erlauben wird der pH-Wert unterhalb des pK-Werts des Proteins gelegt, so daß das Protein positiv geladen vorliegt. Im folgenden soll dieser Fall durchdiskutiert werden.

Für negativ geladene Proteine kehren sich die Spannungsverhältnisse entsprechend um. Geeignete Puffer entsprechen den allgemeinen Bedingungen. Vorzugsweise finden alkaligepufferte Phosphat- und Citratpuffer Anwendung, z. B. Natriumcitrat, 20 mmol/l, pH 2,5.

3.2. Die positiv geladenen Proteine werden aus dieser gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode gebracht und auf anionisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (**4**) (**Fig. 1**) wird auf kathodisches Potential gebracht und der Mikrokanal (**4**) wird mit dem Puffer gefüllt. Die Zusammensetzung des Elektrolyts richtet sich nach der Art der Immobilisierungstechnik und entspricht den allgemeinen Bedingungen. Wahlweise wird ein Modifizier, vorzugsweise ein organisches Lösungsmittel, wie z. B. Methanol zwischen 5 und 30% zuge-

setzt. Die Aufgabe kann mittels UV- oder Fluoreszenzdetektion – nach vorheriger Derivatisierung – im Mikrokanal (1) verfolgt werden.

3.3. Die extrahierten Proteine werden im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran immobilisiert und konzentriert (Fig. 2). Neben den Größenausschlußmembran eignen sich für Proteine auch Ionenaustauschermembranen. Für negativ geladene Proteine finden als weiche Anionenaustauscher vorzugsweise DEAE-Phasen Anwendung. Als starke Anionen- 5
austauscher finden hauptsächlich quartäre Ammoniumphasen Verwendung. In dem hier diskutierten Fall der kationischen Proteine eignen sich als weiche Austauscher hauptsächlich Carbonsäure-Phasen und als starke Austauscher Sulfonsäurephasen. Für spezielle Proteine können die Membranen mit entsprechenden Antikörpern belegt werden und so über Affinität angereichert werden.

3.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierten Proteine können vielfältig modifiziert und analysiert werden (Fig. 3). 10
Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Die Polarität der Spannung wird wie bei der Extraktion und Fokussierung beibehalten. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem enzymatische Spaltungen, Komplexierungen, chemische Derivatisierungen oder Antikörperbindungen möglich.

Beispielsweise kann das Protein mit Reaktivfarbstoffen umgesetzt werden. Vorzugsweise handelt es sich um aminspezifische Farbstoffe wie z. B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in erster Linie nach der gewählten Detektionseinheit. FITC ist beispielsweise ideal für die Fluoreszenzdetektion nach Anregung mit einem Argon-Laser. 15

Deutlich höhere Spezifität kann beispielsweise durch fluoreszenzmarkierten Antikörpern erreicht werden. Bei der anschließenden Trennung wird dann der Protein-Antikörper-Komplex mittels Fluoreszenz bestimmt. 20

3.5. Die konzentrierten Proteine können in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanolitern eluiert werden und stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Kathode im Analysengefäß (14) (Fig. 5) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal und das Puffergefäß (11) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben genannten Zusammensetzung gefüllt. Als nachfolgende Analysen können CE-Trennungen, massenspektrometrische Analysen, Enzymassays, Bindungs- 25
studien oder immunologische Verfahren durchgeführt werden.

3.6. Innerhalb des Mikrosystems sind die Proteine elektrophoretisch analysierbar (Fig. 4).

3.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper, fluoreszierender Enzymsubstrate, fluoreszierender Bindungspartner oder Derivatisierungsreagenzien können die Proteine auch fluoreszenzspektroskopisch identifiziert werden. 30

4. Bakterien

4.1. Die bakterienhaltige Probe wird auf einen solchen pH-Wert gebracht, daß das zu untersuchende Bakterium eine negative Überschußladung trägt. Falls erforderlich können vorher Nukleaseverdaus oder Proteinmodifikationen durchgeführt werden. 35

4.2. Die negativ geladenen Bakterien werden aus dieser gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode gebracht und auf kationisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (4) (Fig. 1) wird auf anodisches Potential gebracht und der Mikrokanal (4) wird mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllt.

Die Zusammensetzung des Elektrolyts richtet sich nach der Art der Immobilisierungstechnik. Die Aufgabe kann mittels UV oder Fluoreszenz verfolgt werden. 40

4.3. Die extrahierten Bakterien werden im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran immobilisiert und konzentriert (Fig. 2). Die Membran arbeitet nach dem Größenausschlußprinzip (Ultrafiltrationsmembran) oder dem Ionenaustauscherprinzip (Anionenaustauscher). Vorzugsweise finden Membranen für die Sterilfiltration mit einer Ausschlußgröße von 0,1–0,45 µm Verwendung. Es können aber auch die gleichen Anionenaustauscher wie für die Proteine eingesetzt werden (vgl. 3.3.). 45

4.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierten Bakterien können beispielsweise auf der Membran lyophilisiert und anschließend die Proteine oder Nukleinsäuren vielfältig modifiziert und analysiert werden (Fig. 3). Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem alle Derivatisierungsverfahren für Proteine und Nukleinsäuren möglich (vgl. 1.4–1.7 und 3.4–3.7). 50

Die Größenausschlußmembran muß im Fall der Bakterienlyse so dimensioniert sein, daß die Zielproteine, bzw. Nukleinsäuren ebenfalls retardiert werden. Es ist prinzipiell jedes Lyseprotokoll geeignet. Vorzugsweise finden denaturierende Bedingungen wie extreme pH-Werte, chaotrope Reagenzien oder Detergenzien Anwendung. Beispiele sind verd. Natronlauge, Guanidinium-Hydrochlorid oder Natriumdodecylsulfat (SDS). 55

4.5. Die konzentrierten Bakterien können in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanolitern eluiert werden und stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Anode im Analysengefäß (14) (Fig. 5) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal (1) und das Puffergefäß (11) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben genannten Zusammensetzung gefüllt. Nach Fraktionierung in ein puffergefülltes Analysengefäß (14) können mit den Bakterien beispielsweise Pathogenitätsassays oder elektrophysiologische Experimente durchgeführt werden. Nach Fraktionierung auf ein planares Analysentarget (14) können die Bakterien beispielsweise direkt licht- oder elektronenmikroskopisch untersucht werden, oder z. B. mikrobiologisch auf einer Agarplatte über Plaques identifiziert werden. 60

4.6. Innerhalb des Mikrosystems sind die Bakterien elektrophoretisch analysierbar (Fig. 4).

4.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper oder fluoreszierender Bindungspartner können die Bakterien auch fluoreszenzspektroskopisch identifiziert werden. 65

Alle gängigen Verfahren der Makromolekül-Isolierung setzen die Prozessierung des gesamten Probenvolumens durch das Extraktionsmedium voraus. Die Handhabung großvolumiger Proben verhindert aber die Miniaturisierung die ihrer-

seits unbedingt nötig ist um die Analysengeschwindigkeit und die Sensitivität zu steigern. Durch die Kombination von direkter elektrophoretischer Extraktion mit einer Immobilisierungsmembran im Mikromaßstab ist es erstmals möglich große Probenvolumina direkt mit einer Nanoanalysetechnik zu kombinieren.

5 Gegenüber den etablierten Verfahren zeichnet sich das Verfahren vor allem durch die vereinfachte Isolierung und extreme Anreicherungsraten aus.

Wird die Probe elektrophoretisch oder mit Druck aus dem Mikrokanal eluiert, können anschließend weitere Nanoanalysenverfahren durchgeführt werden. Nach Verdünnung steht die isolierte Probe auch für konventionelle makroskopische Analysenverfahren zur Verfügung. Das Verfahren stellt dann ein sehr effizientes Probenvorbereitungsmodul für diese Techniken dar.

10 Durch die Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren können in vielen Fällen zusätzliche Amplifikationsschritte vermieden werden. Das Verfahren kann damit beispielsweise die PCR ersetzen.

Das Verfahren kann auch als Aufschlußverfahren für Viren, Bakterien und andere Zellen eingesetzt werden. Beispielsweise wird Virusmaterial isoliert, anschließend wird das Virus im Mikrokanal aufgeschlossen und die freigesetzte Nukleinsäure derivatisiert und analysiert.

15 Das Verfahren kann vorteilhaft zur direkten Nukleinsäure-Sequenzierung für Diagnostik und Forschung eingesetzt werden. Im Falle menschlicher DNA ist hierbei eine Analyse auf erbliche genetische Defekte möglich, die durch Deletionen, Mutationen oder Translokationen hervorgerufen werden. Als mögliche Einsatzgebiete seien hier genannt: Cystische Fibrose, Down's Syndrom, Sichelzellanämie, Huntington's Chorea, Hämophilie A und B. Eine weitere Anwendung dieser Nukleinsäureanalytik liegt in der Tumordiagnostik sowie der allgemeinen Erkennung für genetische Prädispositionen für bestimmte Krankheiten. Hierbei ist die Analyse von Tumorsuppressorgenen und Oncogenen von besonderem Interesse.

Eine weitere Verwendung liegt in der Kombination mit Nukleinsäureamplifizierungsverfahren (wie z. B. PCR).

Das Verfahren kann auch zur direkten Gensondenanalytik von medikamentenresistenten Keimen oder zur Subklassifizierung eingesetzt werden.

25 Als Qualitätssicherungsmethode ermöglicht die Erfindung auch die Kontrolle von gentechnologisch hergestellten Produkten, bei denen Nukleinsäurefreiheit gewährleistet sein muß.

Die Untersuchung von intakten Viren, Bakterien oder deren Nukleinsäure oder deren Proteine kann für die Infektionsdiagnostik eingesetzt werden. Auch Nukleinsäuren oder Proteine von Pilzen oder Parasiten können für diese Zwecke analysiert werden. Als wichtigste virale Vertreter seien hier exemplarisch im Falle der Viren HIV 1 u. 2, HTLV, HSV, CMV, HPV, Hepatitis A, B, C, D, E, F, G, VZV, Rotaviren, EBV und Adenoviren genannt. Zu den wichtigsten bakteriellen Vertretern gehören unter anderen Chlamydien, Mycobakterien, Shigella, Campylobacter, Salmonellen, Neisserien, Staphylokokken, Streptokokken, Pneumokokken. Bei den Pilzen zählen zu den wichtigsten Pathogenen Candida, Aspergillus sowie Cryptococcus.

30 Ein weiteres Einsatzgebiet ist in der Sicherheitsüberwachung von biologischen Proben zu sehen. Die Bedeutung liegt hier z. B. bei der Überprüfung von Blutspenden sowie aller aus Blut hergestellter Produkte. Die Einsatzgebiete entsprechen weitgehend denen der Infektionsdiagnostik.

Dieses Verfahren erlaubt erstmals den direkten hochsensitiven Nachweis von intakten Viren. Dabei können beliebige, auch unbekannte Viren direkt gemessen werden. Dies hat sowohl für die Infektionsdiagnostik, als auch für die Sicherheit von Produkten aus biologischen Materialien enorme Bedeutung, da mit allen anderen Verfahren nur spezielle Viren individuell nachgewiesen werden können.

40 Die durch elektrokinetische Probenvorbereitung erhaltenen Proteine sind aufgrund ihrer Anreicherung und Aufreinigung einer anschließenden immundiagnostischen Analytik leichter zugänglich. Hierbei haben in Humandiagnostik verschiedene Proteine wie z. B. Transferrin, Fibrinogen, β -2 Microglobulin, hCG oder Tumormarker (AFP, CEA, CA 15-3, CA 19-9) hohe diagnostische Relevanz.

45

Beispiele

Elektrokinetische Injektion von Nukleinsäure

50 Zur Überprüfung der elektrokinetischen Injektion von Nukleinsäure wurde Modell-DNA durch das Anlegen von Spannung in einen Mikrokanal injiziert und mittels UV vermessen. Das Experiment sollte zeigen, daß es möglich ist Nukleinsäure elektrokinetisch zu extrahieren.

Es wurde eine Verdünnungsreihe von pBr-DNA (Boehringer Mannheim) von 250 bis 1,25 mg/l hergestellt und im Probengefäß vorgelegt. Nach der Injektion wurde elektrophoretisch getrennt. Die Meßbedingungen befinden sich in Tabelle 1.

55 Trägt man die Peakflächen gegen die DNA-Konzentration auf, so zeigt sich eine Sättigung der Peakflächenzunahme für hohe DNA-Konzentrationen. Die injizierte DNA-Menge wird über 100 mg/l durch den elektrischen Strom und nicht durch die DNA-Konzentration limitiert. Damit konnte gezeigt werden, daß Nukleinsäure über einen weiten Konzentrationsbereich elektrokinetisch aus einer Lösung aufkonzentriert werden kann.

60

Tabelle 1

Meßparameter zur elektrokinetischen Nukleinsäure-Injektionen

65 Spannung	-20 kV
Puffer	Natriumcitrat (20 mmol/l, pH 5,0, Fluka)
Kapillare	PV-gecoatete Quarzkapillare, 50 μ m Innendurchmesser, 64,5 cm Länge, 56 cm zum Detektor (Hewlett-Packard, Waldbronn)

Kapillarelektrophoresegerät	³ HHPCE (Hewlett-Packard, Waldbronn)	
Temperatur	25°C	
Detektion	DAD 190–600 nm, λ 260 \pm 8 nm	
Injektion	elektrokinetisch (20 sec \times 10 kV	
Spülen der Kapillare	1. Wasser (1 min, 5×10^4 Pa)	5
vor der Injektion	2. Wasser (3 min, 5×10^4 Pa)	

Wiederfindungsrate von Größenausschlußmembran

Zur Überprüfung der Retardierung von Nukleinsäure an einer Größenausschlußmembran wurde pBr-DNA elektrokinetisch in den Mikrokanal injiziert und anschließend elektrophoretisch im Kanal zur Anode mobilisiert. Zwischen dem Injektionsende des Kanals und der im Kanal vorhandenen Größenausschlußmembran befand sich ein UV-Detektor (vgl. Fig. 4). Die pBr-DNA (250 mg/l) wurde am Detektor vorbei elektrophoriert und die Elektrophorese wurde so lange fortgesetzt, daß die DNA den Kanal ohne Membran bereits verlassen hätte. Dann wurde die Spannung umgepolt und so die retardierte DNA wieder am Detektor vorbei bewegt. Die Meßparameter befinden sich in Tabelle 2. 15

Tabelle 2

Meßparameter zur elektrophoretischen Nukleinsäure-Wiederfindung von einer Größenausschlußmembran

Spannung	–10 kV für 10 min, dann +10 kV für 10 min	20
Puffer	Tris/Borat (100 mmol/l, pH 8,5)	
Kapillare	gecoatete Quarzkapillare, 75 μ m Innendurchmesser, 34 cm Länge, 8,5 cm zum Detektor (Biorad, München)	
Membran	Nach 20 cm wurde die Kapillare getrennt und nach Einführung der Membran (memfil PCrTE 10 nm von Membrapure) mit einem Teflonschrumpfschlauch wieder verbunden.	25
Kapillarelektrophoresegerät	³ HHPCE (Hewlett-Packard, Waldbronn)	
Temperatur	25°C	
Detektion	DAD 190–600 nm, λ 260 \pm 8 nm	30
Injektion	elektrokinetisch (10 sec \times 10 kV	
Spülen der Kapillare	1. Wasser (1 min, 5×10^4 Pa)	
vor der Injektion	2. Puffer (3 min, 5×10^4 Pa)	

Die elektrokinetisch injizierte DNA migrierte nach 1,7 min durch den UV-Detektor. Ohne Größenausschlußmembran würde die DNA nach 7 min den Kanal wieder verlassen. Die Elektrophorese wurde aber insgesamt 10 min fortgesetzt und dann die Spannung direkt umgepolt. Die retardierte DNA in der Kapillare wanderte wieder zurück durch den UV-Detektor. Nach 12,05 min konnte ein Signal detektiert werden, das exakt der Peakfläche der injizierten DNA entsprach. Das analoge Experiment mit 3-Nitrobenzolsulfonsäure zeigte, wie erwartet, nur den Injektionspeak und damit keine Retardierung an der Größenausschlußmembran. 40

In einem weiteren Experiment wurden drei aufeinanderfolgende Injektionen an Nukleinsäure durchgeführt und mit identischen Bedingungen analysiert. Das Elektropherogramm zeigte eindeutig die Aufkonzentrierung der drei Nukleinsäure-Injektionen in einem Signal. Die Peakflächen der drei Einzelinjektionen entsprachen exakt der Peakfläche der retardierten DNA. Damit wurde gezeigt, daß Makromoleküle an der Membran im Mikrokanal elektrophoretisch immobilisiert und quantitativ remobilisiert werden können. 45

Nukleinsäure-Extraktion

Für die Nukleinsäure-Aufkonzentrierung ist es notwendig die vorhandene Nukleinsäure-Menge aus einer bestimmten Lösung möglichst quantitativ in den Mikrokanal zu überführen. Wenn die gesamte Nukleinsäure injiziert ist, dürfte bei einer 2. Injektion aus dem selben Probengefäß nur noch sehr wenig Nukleinsäure extrahierbar sein. 50

Um die DNA-Menge möglichst gering zu halten wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff YOYO (Molecular Probes) angefärbt und mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (LIF) detektiert. Dazu wurde YOYO (0,4 mmol/l, in 76 μ l TBE-Puffer) vorgelegt und mit 1–4 μ l der pBr-DNA-Lösung (1 mg/l) versetzt und mindestens 30 min bei RT vor der Messung inkubiert. Die Meßparameter befinden sich in Tabelle 3. 55

Tabelle 3

Meßparameter zur elektrophoretischen Nukleinsäure-Injektionen

Spannung	–10 kV für 10 min, dann + 10 kV für 10 min	60
Puffer	Tris/Borat (100 mmol/l, pH 8,5)	
Kapillare	PV-gecoatete Quarzkapillare, 75 μ m Innendurchmesser, 57 cm Länge, 50 cm zum Detektor (Biorad, München)	
Kapillarelektrophoresegerät	PACE 5510 (Beckmann, München)	65
Temperatur	25°C	
Detektion	LIF (Argon) EX 488, EM 520 nm, Gain 100	
Injektion	2 \times elektrokinetisch (60 min \times –10 kV) aus 50 μ l	

Spülen der Kapillare
vor der Injektion

1. Wasser (1 min, 5×10^4 Pa)
2. Puffer (3 min, 5×10^4 Pa)

Die Detektionsprofile sahen so aus, daß nach ca. 10 min ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen war, der rasch ein Plateau erreichte. Nach ca. 30 min fiel die Fluoreszenz wieder ab, verbunden mit einem allmählichen Anstieg des Stroms im Kanal. Die Höhe des Plateaus korrelierte mit der Menge an DNA. Bei der zweiten Injektion war aus keiner Probe noch signifikante Fluoreszenz zu injizieren. Die Daten belegen die vollständige Extraktion der pBr-DNA bei der 1. Injektion. Aus dem Fluoreszenzverlauf schließen wir, daß die gesamte Nukleinsäure bereits nach 30 min vollständig injiziert war.

Diese Daten zeigen eindeutig, daß die gesamte Nukleinsäure eines Probenvolumens elektrokinetisch in einen Mikrokanal injiziert werden kann. In Kombination mit der Größenausschlußmembran sollte es möglich sein diese Nukleinsäure in wenigen Nanoliter aufzukonzentrieren und so nachweisbar zu machen.

Nukleinsäure-Aufkonzentrierung

Mit den Meßbedingungen von Tab. 2 wurde Nukleinsäure in den Mikrokanal mit eingebauter Membran injiziert. Dazu wurde pBr-DNA (2,5 mg/l, 50 µl) 25 min injiziert und anschließend mit dem Trennpuffer fokussiert (**Fig. 2**). Bei dieser niedrigen Konzentration war die DNA direkt nicht nachweisbar. Nach 10 min wurde die Spannung umgepolt und die aufkonzentrierte DNA wanderte nach 12 min als intensiver Peak zurück durch den Detektor. Praktisch die gesamte DNA der 50 µl-Probe (0,1 mg) war in weniger als 50 nl (1 cm in der Kapillare) aufkonzentriert. Der Anreicherungsfaktor lag damit bei Faktor 1000.

Derivatisierung auf der Membran

Zur Überprüfung der Derivatisierung von Nukleinsäure an einer Größenausschlußmembran wurde pBr-DNA wie bereits beschreiben elektrokinetisch injiziert und auf der Membran immobilisiert (Tab. 2). Nach der Immobilisierung wurde die Spannung aber nicht sofort umgekehrt, sondern das zur DNA auf der anderen Seite der Membran gelegene Puffergefäß wurde gegen eine Pufferlösung ersetzt, die kationischen interkalierenden Farbstoff enthielt (YOYO, 0,4 mmol/l, Molecular Probes). Die Spannung wurde für weitere 20 Minuten beibehalten, wobei der Farbstoff durch den Mikrokanal, und durch die Membran wanderte. Die DNA wurde also mit YOYO auf der Membran inkubiert. Danach wurde nochmals 10 min ohne Farbstoff elektrophoriert, um restliches YOYO wieder aus der Kapillare zu entfernen. Dann wurde die Spannung umgepolt und so die retardierte und angefärbte DNA wieder am Detektor vorbei bewegt.

Die elektrokinetisch injizierte DNA migrierte nach 2 min durch den UV-Detektor. Zwei Minuten nach der Umpolung konnte ein Signal mit größerer Peakfläche detektiert werden, das der angefärbten DNA entsprach. Die mittels Dioden-Array-Detektion (DAD) im Mikrokanal erzeugte UV-VIS-Spektrum der injizierten DNA zeigte das typische UV-Spektrum mit 2 Absorptionsmaxima bei 200 und 260 nm. Nach der Inkubation mit YOYO auf der Membran wies die DNA zusätzlich ein Absorptionsmaximum bei 490 nm auf. Dies entspricht exakt dem Absorptionsmaximum der mit YOYO interkalierten DNA. Damit konnte bewiesen werden, daß Makromoleküle im Mikrokanal derivatisiert werden können.

Kopplung mit Elektronenmikroskopie

Als Beweis der weiteren Analyse von aufbereiteten Makromolekülen, soll die Kopplung mit der Elektronenmikroskopie (EM) dienen.

Herpes Simplex Viren (Typ 2) wurden mit YOYO (Molecular Probes) angefärbt und mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (LIF) detektiert. Dazu wurde YOYO (0,4 mmol/l, in 76 µl TBE-Puffer) vorgelegt und mit 4 µl der HSV-2-Lösung (5×10^5 Viren/ml) versetzt und mindestens 30 min bei RT vor der Messung inkubiert. Die Meßparameter befinden sich in Tabelle 3.

Die wenigen injizierten, interkalierten Viren (10–20) wurden als einzelne Signale detektiert. Zur Identifizierung der Signale wurde die gleiche Probe unter vergleichbaren Elektrophoresebedingungen an einer Ponce-CB (Lauerlabs) mit Nanofraktionssammler (Probot, BM-Instruments) analysiert. Das Ende des Mikrokanals wurde dabei zeitgesteuert auf unterschiedliche Elektronenmikroskopieträger fraktioniert und nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat im EM untersucht.

In den erwarteten Fraktionen konnten intakte HSV-Partikel eindeutig nachgewiesen werden. Damit wurde am Beispiel von Viren erstmals gezeigt, daß Makromoleküle nach der elektrophoretischen Trennung für weitere Analysen als intakte Partikel zur Verfügung stehen.

Legenden zu Abbildungen

Fig. 1: Schematische Darstellung der Aufreinigungsapparatur. Ein Mikrokanal (1) mit eingebauter Membran (2) verbindet 2 Puffergefäße (3, 4). Über eingebrachte Elektroden können diese Puffergefäße auf unterschiedliche Spannungspotentiale gebracht werden (5). Über eine Druckregelung können auch unterschiedliche Drücke angelegt werden (6). In (3) befindet sich die zu untersuchende Probe.

Fig. 2: Schematische Darstellung der Aufkonzentrierung. Das zu untersuchende Makromolekül wurde elektrokinetisch in den Mikrokanal (1) mit eingebauter Membran (2) injiziert. Das Probengefäß wurde bereits durch den Konzentrationspuffer (7) ersetzt. Die Makromoleküle wandern bis zur Membran und werden dort festgehalten.

Fig. 3: Schematische Darstellung der Probenmodifizierung. In den Reaktionsgefäße (8, 9) befinden sich die Derivatisierungsreagenzien, die entweder elektrokinetisch und/oder mit Hilfe von Druck zu den aufkonzentrierten Makromolekülen gebracht werden.

Fig. 4: Schematische Darstellung eines on-line Analysenverfahrens. Das aufkonzentrierte und modifizierte Makromolekül wird elektrokinetisch im Mikrokanal (1) an einem Detektorfenster (12) vorbei mobilisiert, so daß die spektroskopischen Eigenschaften analysiert und ausgewertet werden können (13).

Fig. 5: Schematische Darstellung der Fraktionierung des aufgereinigten Makromoleküls. Die aufkonzentrierte Probe wird in dem Probengefäß oder auf dem Analysentarget (14) aufgefangen und steht für weitergehende Analysen zur Verfügung.

Fig. 6: Schematische Darstellung der high-throughput Aufreinigungsapparatur. Eine Vielzahl von Mikrokanälen wird so angeordnet, daß sie mit dem Probenformat (z. B. Mikrotiterplatte) kompatibel sind. Die Membran (2) wird über das gesamte Format eingebracht und mit einem zweiten Mikrokanal-Array (15) verbunden. Die Vorgehensweise dieser multiplen Anordnungen entspricht Fig. 1–5.

Fig. 7: Schematische Darstellung der Anreicherungsapparatur für salzhaltige Lösungen. Neben dem Mikrokanal (1) befindet sich ein Flachkanal (16), der mit dem Mikrokanal (1) über den Transferkanal (17) verbunden ist. Der Flachkanal erlaubt sehr viel höhere Flußraten und damit höhere Anreicherungs faktoren. Details im Text.

Fig. 8: Schematische Darstellung der Anreicherung aus extrem salzhaltiger Lösung in der Aufsicht. Die Anreicherung erfolgt durch Anlegen einer Spannung (6) an den Flachkanal (16) (Fig. 8a). Die Spannung wird so lange beibehalten, bis alle Nukleinsäuren an der Membranoberfläche (2) immobilisiert sind (Fig. 8b). Wird nun zwischen dem Flachkanal (16) und dem Mikrokanal (1), wie angegeben, eine Spannung (6) angelegt, so wandert die aufgereinigte und aufkonzentrierte Nukleinsäure von der großen Membranoberfläche des Flachkanals (16) zur Membran des Mikrokanals (1) (Fig. 8c). Details im Text.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung und Aufkonzentrierung von Makromolekülen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Makromoleküle in einem Mikrokanal auf einer Membran elektrokinetisch gesammelt und anschließend analysiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren, Viren, Proteine, Bakterien oder Pilze in einem Mikrokanal auf einer Membran elektrokinetisch gesammelt und anschließend analysiert werden.
3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, wobei die Probe auf der Membran derivatisiert wird.
4. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 als Probenvorbereitung für weitere Analysenverfahren.
5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Probenvorbereitung für MS, Gelelektrophorese, PCR, TEM, Nukleinsäuresequenzierung, Immundiagnostik und Hybridisierungen.
6. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 in Form eines Chip-Moduls mit eingebetteter Membran, wobei 1–400 Kapillaren nebeneinander angeordnet sind.
7. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, enthaltend eine Membran aus Polyethersulfon (PES), Polyester, vliesgestütztem Acrylpolymer, Polytetrafluorethylen (PTFE), Polysulfon, Polypropylen (PP), Glasfaser, Nylon oder Polycarbonat.
8. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 in Form eines Flachkanals zur Analyse von salzhaltigen Proben.
9. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 zur Anreicherung und zur Analyse von Makromolekülen.
10. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 in der Qualitätskontrolle von biologischen Präparaten.
11. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 zur direkten Infektionsdiagnostik.
12. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 zur amplifikationsfreien Nukleinsäureanalytik.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

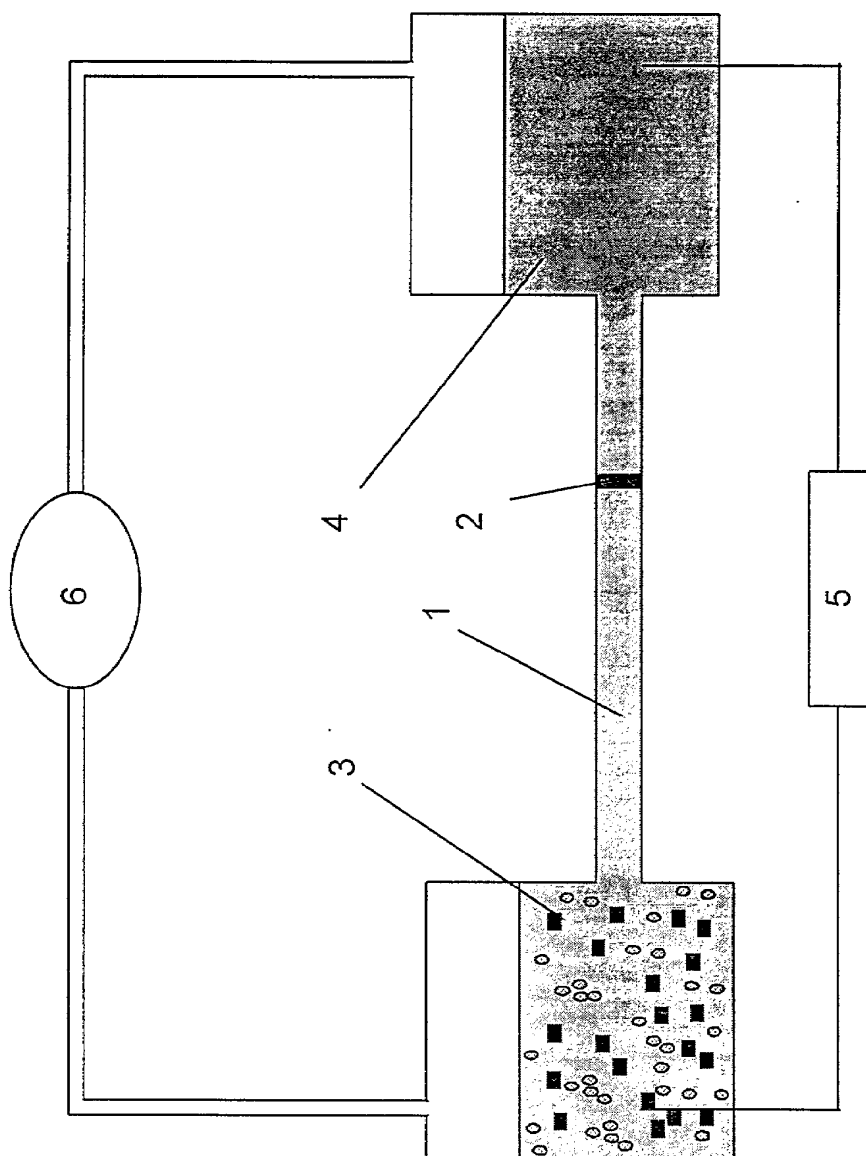


Figure 1

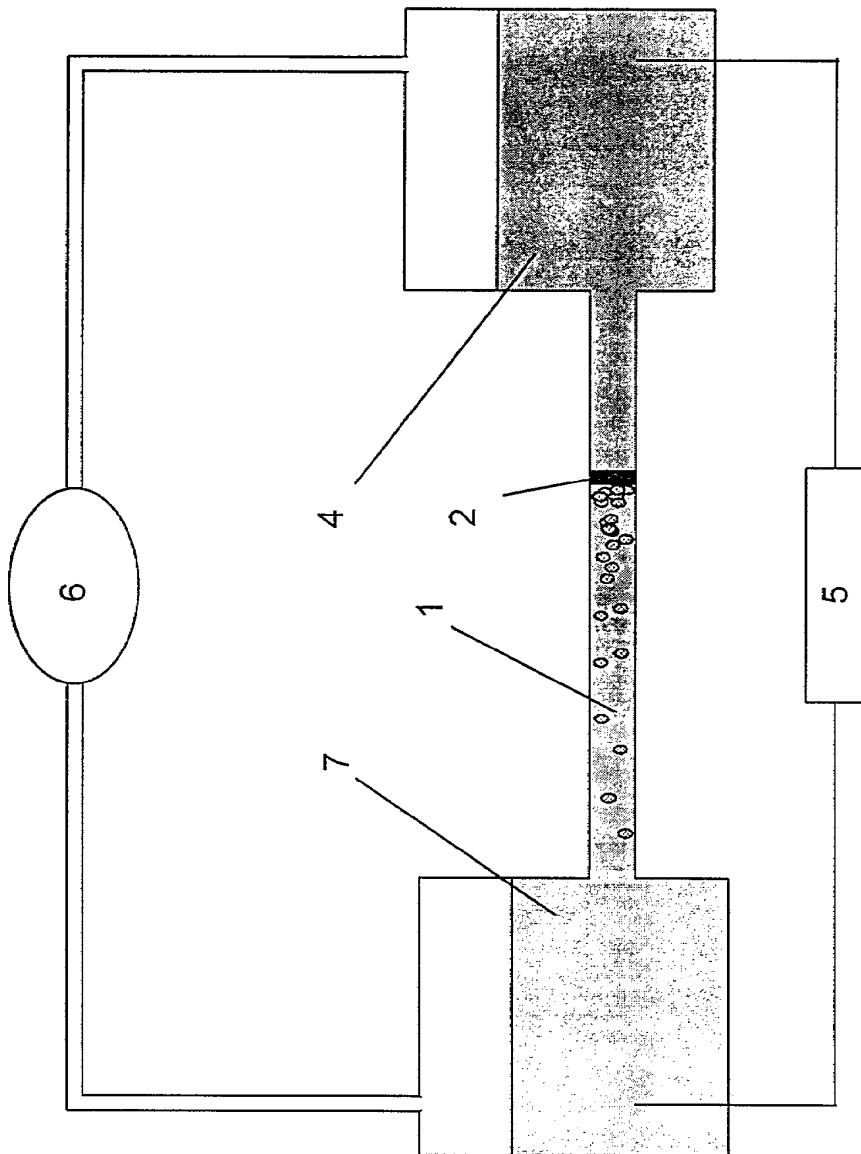


Figure 2

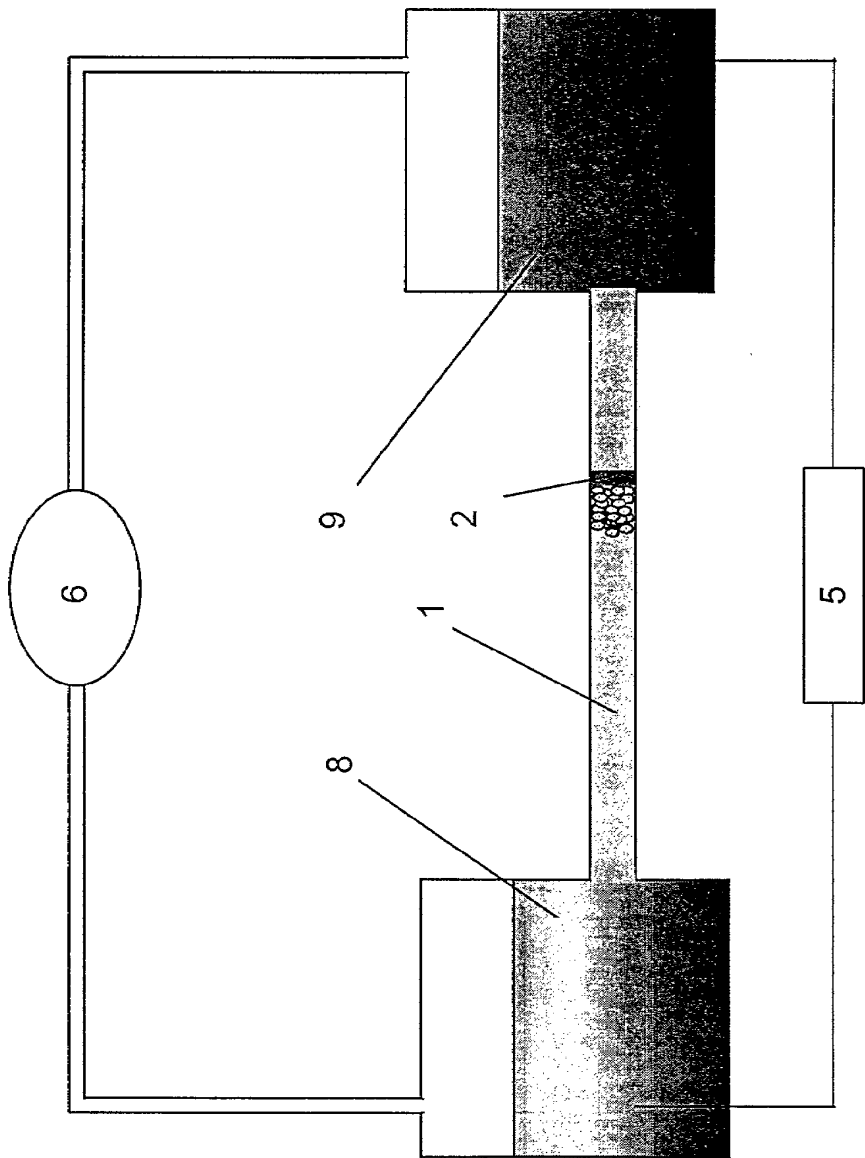


Figure 3

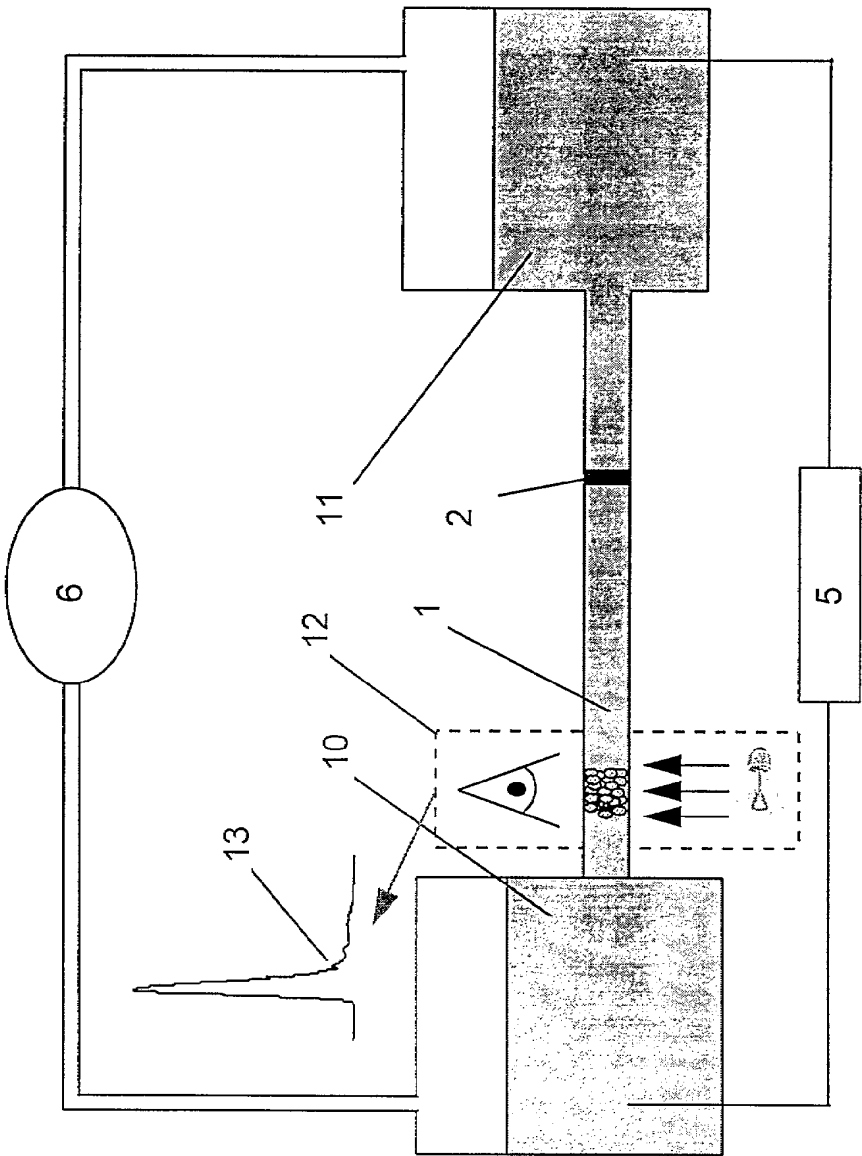


Figure 4

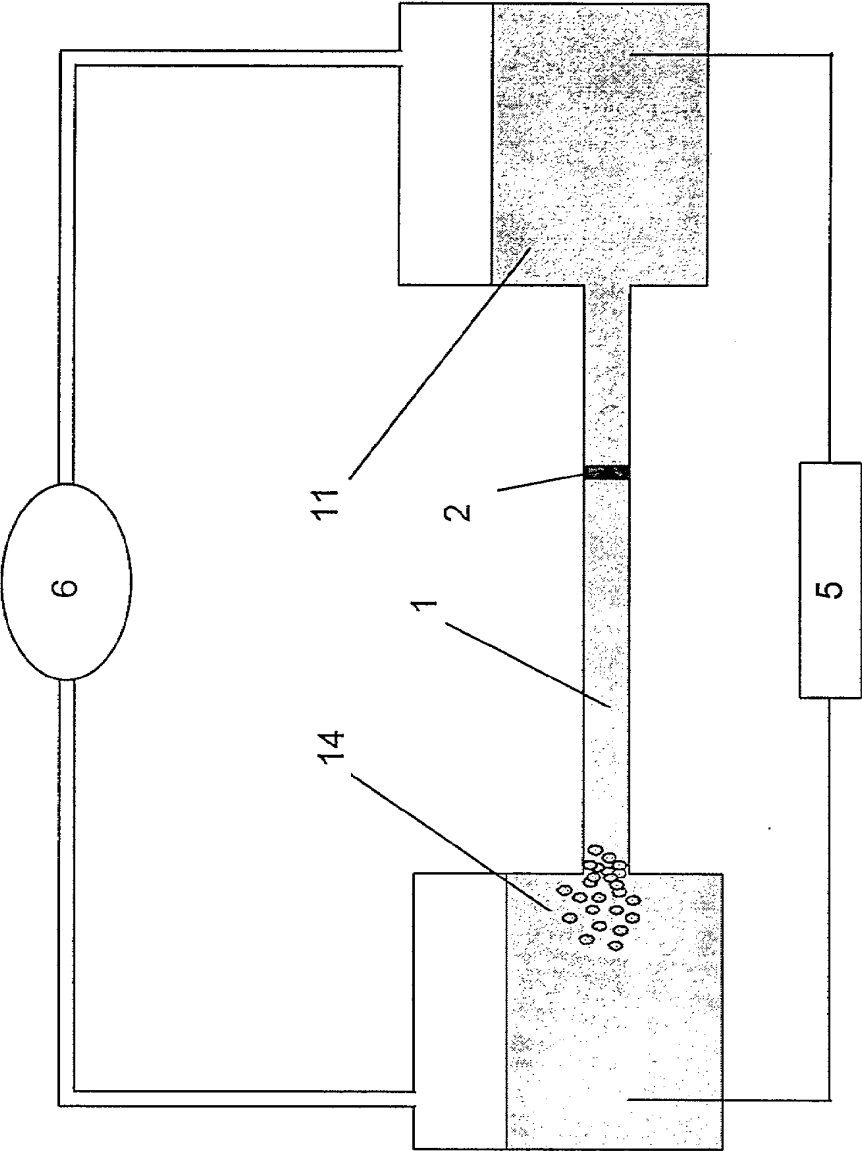


Figure 5

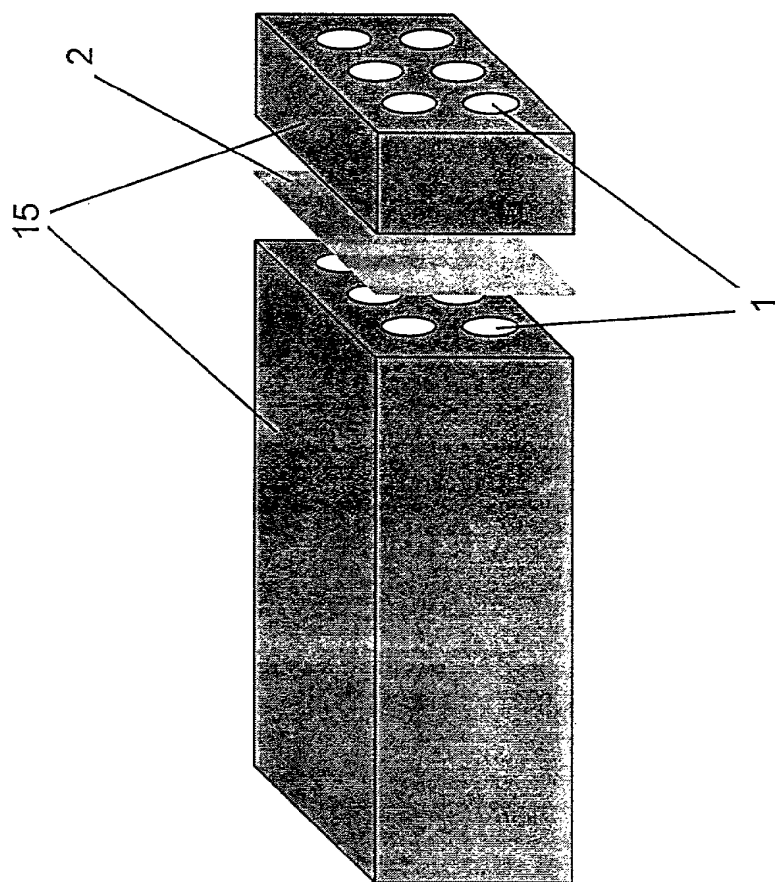


Figure 6

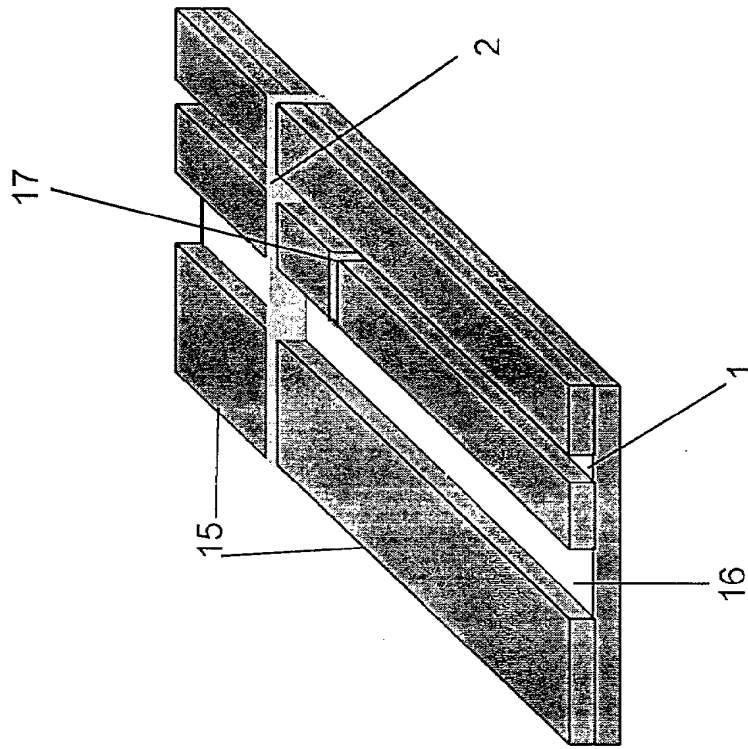


Figure 7

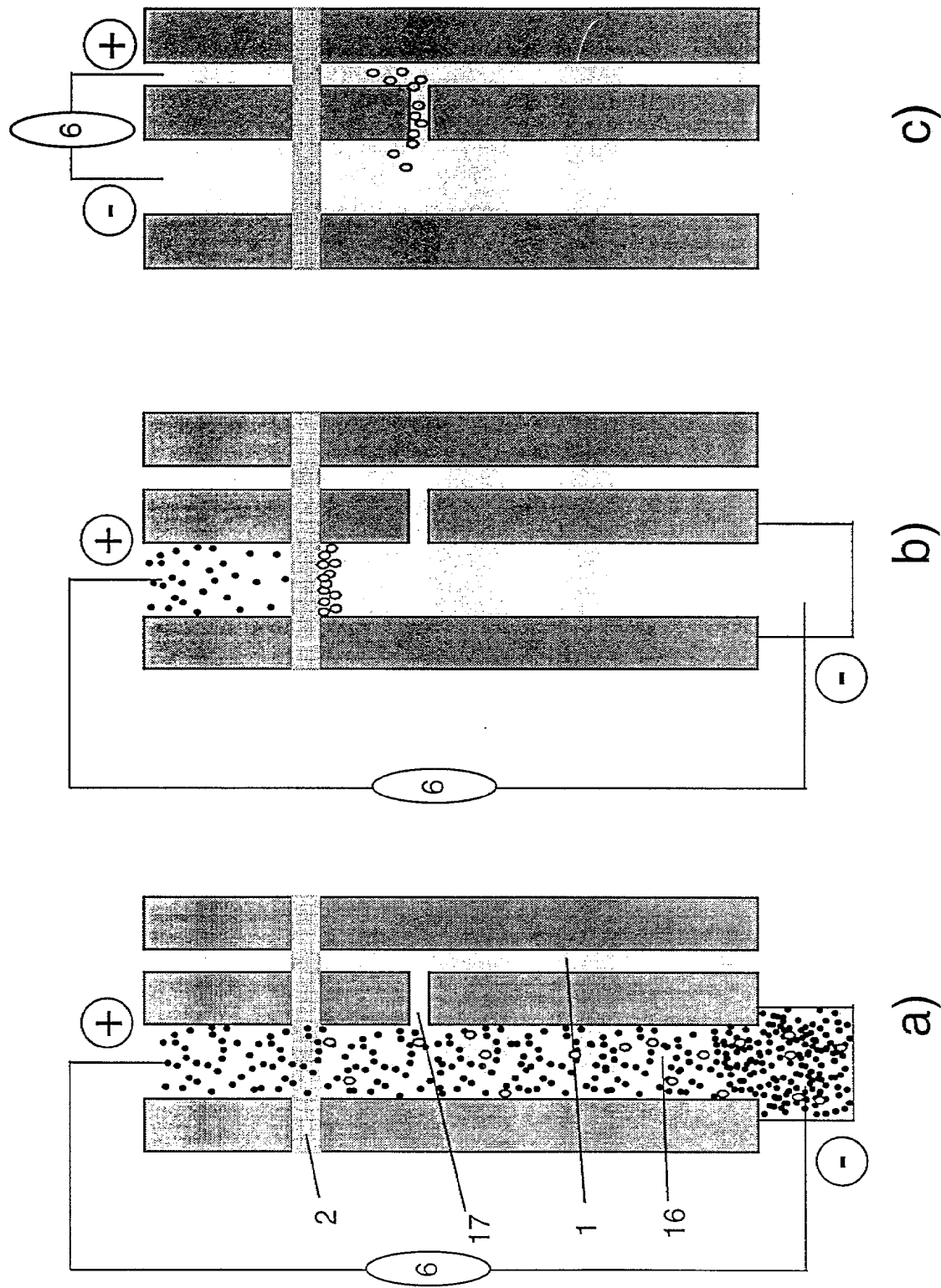


Figure 8